sebia

CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E)

Ref. 2007

IVD

CE

2009/04

USO

El kit CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) permite la separación en medio alcalino (pH 9,4) de las hemoglobinas normales de la sangre humana (A, F y A2) y la detección de las principales hemoglobinas anormales (especialmente las hemoglobinas S, C, E y D), mediante electroforesis capilar en el sistema automático CAPILLARYS.
El sistema CAPILLARYS permite realizar todas las etapas de la electroforesis hasta la obtención del perfil de las hemoglobinas para el análisis cualitativo o cuantitativo. El análisis puede realizarse usando el hemolizado de glóbulos rojos sedimentados, centrifugados o lavados; el lavado de los glóbulos rojos no es indispensable.
Las hemoglobinas, separadas en capilares de sílice fundido, son detectadas directamente en una burbuja existente en el capilar mediante espectrofotometría de absorbancia a 415 nm, que es la longitud de onda de absorción específica de las hemoglobinas.
Los perfiles electroforéticos son analizados visualmente para detectar las anomalías. La detección directa proporciona automáticamente una cuantificación relativa precisa de cada fracción individual de las hemoglobinas que presenta un interés particular, como la hemoglobina A2 en el diagnóstico de las ß talasemias. Además, la buena separación de las diferentes fracciones permite confirmar la identificación de las variantes de la hemoglobina, y en particular, diferenciar la hemoglobina S de la hemoglobina D, y la hemoglobina E de la hemoglobina C.
La cuantificación de la hemoglobina A2 también se puede realizar en presencia de hemoglobina E.

Para uso en diagnóstico *In Vitro*.

PRINCIPIO DEL TEST

La hemoglobina es una molécula compleja compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, idénticas dos a dos, estando cada cadena ligada al hemo, que es un núcleo tetrapirrólico (porfirina) ligado a un átomo de hierro. El hemo es común a todas las hemoglobinas. La parte proteica responsable del tipo de hemoglobina se denomina globina. Se conocen principalmente las cadenas polipeptídicas α, β, δ y γ. En humanos podemos encontrar las hemoglobinas normales siguientes:

- Hemoglobina A..... = α 2 β 2
- Hemoglobina A2..... = α 2 δ 2
- Hemoglobina fetal F..... = α 2 γ 2

La cadena α es común a estas tres hemoglobinas.

La estructura espacial de la hemoglobina (como la del resto de las proteínas) depende de la naturaleza y de la secuencia de aminoácidos que forman las cadenas. Las uniones que se forman entre los diferentes aminoácidos son responsables de la forma de la molécula, de su estabilidad y de sus propiedades. Situadas en un campo eléctrico, las hemoglobinas se desplazan en función de su carga, del tamaño de la molécula, de la fuerza iónica, del pH del tampón y de la naturaleza del soporte empleado. Las variantes de la hemoglobina son debidas a mutaciones de algunos aminoácidos que implican cargas de superficie diferentes en la hemoglobina y, por consiguiente, movilidades diferentes en la electroforesis.
Las anomalías de la hemoglobina son de dos tipos:

- anomalías cualitativas o de estructura, que se denominan hemoglobinopatías;
- anomalías cuantitativas o de regulación, que se denominan talasemias.

La electroforesis de las hemoglobinas de la sangre humana es un análisis muy útil en el laboratorio de análisis clínicos para investigar las anomalías cualitativas y cuantitativas de la hemoglobina. Paralelamente a las técnicas de electroforesis en diferentes soportes, entre los que está el gel de agarosa, se ha desarrollado la técnica de electroforesis capilar, que ofrece las ventajas de una automatización competa del análisis, separaciones rápidas y una excelente resolución. Se define como una técnica de separación electrocinética realizada en un tubo de diámetro interno inferior a 100 μm lleno de un tampón compuesto por electrolitos. Se considera una tecnología intermedia entre la electroforesis de zona en soporte y la cromatografía líquida.
El sistema CAPILLARYS usa el principio de la electroforesis capilar en solución libre, que representa la forma más corriente de electroforesis capilar. Permite la separación de moléculas cargadas en función de su movilidad electroforética propia en un tampón de pH dado, y, según el pH del electrolito, de un flujo electroendosmótico más o menos importante. El sistema CAPILLARYS posee una serie de capilares en paralelo, permitiendo realizar 7 análisis simultáneos. En este sistema, la inyección en los capilares de las muestras diluidas con solución hemolizante se realiza en el ánodo por aspiración. La separación se realiza a continuación aplicando una diferencia de potencial de varios miles de voltios en los extremos de cada capilar. La detección directa de las hemoglobinas se efectúa a 415 nm en el lado catódico. Los capilares se lavan antes de cada análisis con una solución de lavado, y luego con el tampón de análisis. Con el tampón de pH alcalino usado, el orden de migración de las principales hemoglobinas normales y anormales es el siguiente, del cátodo al ánodo: δA'2 (variante de A2), C, A2/O-Arab, E, S, D, G-Filadelfia, F, A, Hope, Bart, J, N-Baltimore y H. Hay que tener en cuenta que la anhidrasa carbónica no se detecta en el perfil electroforético de las hemoglobinas en la electroforesis capilar, lo que permite identificar algunas variantes de la hemoglobina A2 en su zona de migración.

REACTIVOS SUMINISTRADOS EN EL KIT CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E)

COMPONENTES	REF. N° 2007
Tampón (listo para usar)	2 viales de 700 mL
Solución hemolizante (lista para usar)	1 vial de 440 mL
Solución de lavado (solución concentrada)	1 vial de 75 mL
Segmentos de dilución	1 bolsa de 90
Filtros	3 filtros

PARA OBTENER RESULTADOS ÓPTIMOS :

Los elementos de un mismo kit deben ser usados conjuntamente y según las instrucciones suministradas.

LEA DETENIDAMENTE LAS INSTRUCCIONES.

ATENCIÓN : No use agua destilada o desionizada comercial, como por ejemplo el agua para planchar (riesgo de deterioro importante de los capilares). Use exclusivamente agua de calidad ultrapura, como el agua para inyección.

1. TAMPÓN

Preparación
El tampón está listo para usar. Contiene: tampón alcalino, pH 9,4 ; aditivos, inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

Uso
Tampón para el análisis de las hemoglobinas mediante electroforesis capilar.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro
El tampón debe conservarse en nevera (entre 2 y 8 °C). Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en la etiqueta del vial de tampón. No almacene el tampón a temperatura ambiente, cerca de una ventana o de una fuente de calor.
NO LO CONGELE.

IMPORTANTE: Después de conservarlo a 2 - 8 °C y antes de usarlo, conviene dejar que el tampón se atempere, lo que requiere unas 3 horas si el contenedor de tampón está lleno. Si esta indicación no se respeta, el funcionamiento de la técnica puede verse afectado.

ATENCIÓN: No caliente el tampón al baño maría.

Un contenedor de tampón empezado, instalado en el CAPILLARYS, es estable un máximo de **1 mes** (acumulado) a temperatura ambiente (de 15 a 30 °C). **Después de cada uso, el tampón debe conservarse imperativamente en nevera (2 - 8 °C) lo antes posible**, siendo entonces estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial de tampón.

IMPORTANTE: El tiempo total acumulado que el tampón puede estar a temperatura ambiente no debe exceder **1 mes**. Esta duración de conservación de 1 mes tiene en cuenta la duración de los tiempos de atemperamiento del tampón.

Deseche el tampón si cambia de aspecto o aparece turbidez debido a contaminación microbiana, a un precipitado o a partículas en suspensión.

2. SOLUCIÓN HEMOLIZANTE

Preparación
La solución hemolizante está lista para usar. Es un tampón con aditivos, inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

Uso
Para la dilución y la hemólisis de los glóbulos rojos.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro
La solución hemolisante debe conservarse en nevera (entre 2 y 8 °C). Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en la etiqueta del vial de solución hemolisante. No conserve la solución hemolisante a temperatura ambiente, cerca de una ventana o de una fuente de calor. NO LA CONGELE.
Deseche la solución hemolisante si cambia de aspecto o aparece turbidez debido a contaminación microbiana, a un precipitado o a partículas en suspensión.

IMPORTANTE: Después de cada uso, cierre herméticamente el vial de solución hemolisante de inmediato y consérvelo en nevera

NOTA: El color amarillo de la solución hemolisante es normal.

3. SOLUCIÓN DE LAVADO

Preparación
El vial de solución de lavado concentrada debe completarse hasta 750 mL con agua destilada o desionizada.

ATENCIÓN: La solución de lavado contiene sosa cáustica. Solución corrosiva. Provoca quemaduras graves. Consérvela lejos del alcance de los niños. En caso de contacto con los ojos, lávelos inmediatamente con agua en abundancia y consulte a un especialista. Quítese inmediatamente cualquier prenda manchada o salpicada. Use guantes adecuados y un sistema de protección ocular/facial.

Uso
Para lavar los capilares después de la separación electroforética de las hemoglobinas.

IMPORTANTE : Antes de llenar el contenedor de solución de lavado, se recomienda lavar con agua destilada o desionizada en abundancia el cuello del contenedor, el conector y el tubo para evitar la acumulación de sales.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro
Las soluciones de lavado concentrada y diluida deben conservarse a temperatura ambiente o en nevera en contenedores cerrados para evitar la evaporación. La solución concentrada es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en la etiqueta del vial de solución de lavado.
La solución diluida es estable durante 3 meses.
Deseche la solución de lavado diluida si cambia de aspecto o aparece turbidez debido a contaminación microbiana.

4. SEGMENTOS DE DILUCIÓN

Uso
Segmentos de dilución coloreados, de un solo uso, específicos de la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E), para que el aparato realice la dilución de las muestras de sangre. Deben colocarse en el cargador de muestras.

ATENCIÓN: Manipule con precaución los segmentos de dilución que contengan muestras biológicas.

5. FILTROS

Uso
Filtros de un solo uso para el filtrado del tampón, de la solución de lavado reconstituida y del agua destilada o desionizada (usada para la limpieza de los capilares).

IMPORTANTE: Cambie sistemáticamente los tres filtros al empezar un kit nuevo.

Enrosque un filtro al final de cada tubo que cuelga de los tapones de los contenedores de tampón, de solución de lavado y agua destilada o desionizada. Al cambiar los filtros, lave los conectores y los tubos con agua destilada o desionizada. Los filtros usados también deben lavarse con agua antes de su eliminación.
El filtro destinado al tampón de análisis debe usarse para la filtración de la totalidad de los dos contenedores de tampón listo para usar ; los otros dos filtros están destinados a la filtración de la solución de lavado reconstituida y del agua destilada o desionizada (solución de limpieza).

Conservación
Antes de usarlos, los filtros deben conservarse en su embalaje original herméticamente cerrado en un lugar seco a temperatura ambiente o en nevera.

REACTIVOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

1. CONTROL Hb A2 NORMAL

Composición

El Control Hb A2 Normal (SEBIA, referencia nº 4778) se obtiene a partir de una mezcla de sangres humanas normales. Un procedimiento de estabilización permite conservar el Control Hb A2 Normal en forma liofilizada.

Aplicación

El Control Hb A2 Normal está destinado al control de la migración **antes de realizar una nueva serie de análisis**, así como al control de calidad del método de determinación de la hemoglobina humana A2 mediante la técnica electroforética CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E).
Reconstituya, con precisión, cada vial liofilizado de Control Hb A2 Normal con el volumen de agua destilada o desionizada indicado en las instrucciones del Control Hb A2 Normal. Déjelo en reposo 30 minutos y después agítelo suavemente (evite la formación de espuma).

Control de migración: El Control Hb A2 Normal debe ser usado de la forma siguiente:

- Dispense el Control Hb A2 Normal reconstituido en un microtubo.
- Corte el tapón del microtubo.
- Ponga el microtubo, colocado en un tubo de hemólisis nuevo que servirá de soporte (e identificado con la etiqueta de códigos de barras del Control Hb A2 Normal), en la posición 1 del cargador específico nº 0 del CAPILLARYS, previsto a tal efecto, y coloque un segmento de dilución verde nuevo en el cargador.
- Dispense 4 mL de solución hemolisante CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) en un tubo de hemólisis sin que se formen burbujas de aire y coloque este tubo en la posición 8 del cargador nº 0.

  IMPORTANTE: Compruebe que no haya espuma en el tubo de solución hemolisante antes de colocarlo en el cargador.
- Inicio del análisis: Introduzca el cargador nº 0 en el sistema CAPILLARYS, seleccione en la ventana que aparece en pantalla "Dilución automática" y valide.
- **Después de cada cambio del contenedor del tampón de análisis (incluso si el lote es el mismo) o del modo de trabajo, después de un ciclo de limpieza de los capilares con el CAPICLEAN, después de una actualización del programa o después de una activación de los capilares**, realice una segunda serie de análisis con el control, volviendo a introducir inmediatamente el mismo cargador n° 0 con el mismo segmento de dilución que contiene el Control Hb A2 Normal diluido en el primer análisis, y con el tubo de hemólisis vacío identificado con el código de barras del Control Hb A2 Normal en la posición 1. En la ventana que aparece en pantalla con el título « Control Hb A2 Normal », seleccione « Dilución manual » y valide.

Los resultados obtenidos son entonces tenidos en cuenta automáticamente por el programa para el análisis de los resultados.

IMPORTANTE: El pico de hemoglobina A del Control Hb A2 Normal debe presentar una densidad óptica (DO) mínima de 0,12. Por debajo de este valor el centrado del perfil electroforético no se puede hacer correctamente. Durante el análisis de las muestras, la identificación de las fracciones de la hemoglobina, Hb A, Hb F, Hb A2 y Hb C, así como la determinación de la zona de migración de otras variantes corren el riesgo de ser imposibles o erróneas (vea el párrafo ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS).

IMPORTANTE: Para un uso óptimo del Control Hb A2 Normal, es indispensable usar las etiquetas con códigos de barras destinadas a identificar el tubo de hemólisis que servirá de soporte al microtubo que contiene el Control Hb A2 (corte el tapón del microtubo antes de usarlo).

NOTAS: Al usar por primera vez el programa de análisis "HEMOGLOBIN(E)" en el automático para electroforesis CAPILLARYS, se recomienda realizar 3 series de análisis sucesivas con el Control Hb A2 Normal.

Después de instalar el instrumento automático CAPILLARYS, al realizar la primera serie de análisis de sangres, aparecerá un símbolo de alerta rojo en caso de ausencia de hemoglobina A en una de las muestras (que indica que no es posible centrar el perfil, vea el párrafo "Análisis de los resultados").

Se aconseja entonces analizar una muestra que contenga hemoglobina A en el capilar afectado y volver a analizar la muestra sin hemoglobina A colocándola en un capilar que ya haya detectado la presencia de hemoglobina A.

Control de calidad: El Control Hb A2 Normal debe ser usado como una sangre humana normal. Después de la reconstitución, use directamente el Control Hb A2 Normal como una muestra de sangre a analizar o como control de la migración (con el cargador nº 0, vea el párrafo anterior). Será tratado automáticamente con la solución hemolisante. Se recomienda incluir el Control Hb A2 Normal en cada serie de análisis. Los valores obtenidos deben estar comprendidos entre los valores específicos de cada lote.

IMPORTANTE: Para un uso óptimo del Control Hb A2 Normal colocado en un cargador cualquiera, es indispensable usar una etiqueta con código de barras, destinada a identificar el tubo de hemólisis que servirá de soporte al microtubo que contenga el Control Hb A2 (corte el tapón del microtubo antes de usarlo).

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

Antes de la reconstitución, el Control Hb A2 Normal debe conservarse en nevera (2 - 8 °C) hasta la fecha de caducidad indicada en los viales o en la caja.
El Control Hb A2 Normal reconstituido debe conservarse en nevera (2 - 8 °C) y usarse en el plazo de una semana para evitar que se contamine o desnaturalice.
Puede congelarse (en alícuotas) y conservarse como máximo 6 meses a - 20 °C.

IMPORTANTE: Después de conservarlo a 2 - 8 °C ó a - 20 °C, homogenice el Control Hb A2 Normal reconstituido antes de analizarlo en el CAPILLARYS.

NOTA: Para un uso óptimo en el CAPILLARYS, se recomienda repartir alícuotas del Control en microtubos antes de congelarlo.

El Control Hb A2 Normal descongelado debe conservarse en nevera (2 - 8 °C) y usarse ese mismo día. No congele y descongele el control más de 15 veces.
El Control Hb A2 Normal hemolisado debe conservarse en nevera (2 - 8 °C) y usarse ese mismo día.
El segmento de dilución que contenga el Control Hb A2 Normal hemolisado puede congelarse a - 20 °C. No congele y descongele el segmenfo que contenga el control hemolisado más de 2 veces.

IMPORTANTE: No deje a temperatura ambiente el segmento de dilución que contenga el control hemolisado.

NOTA: Durante el transporte, el Control Hb A2 Normal liofilizado puede permanecer a tamperatura ambiente (entre 15 y 30 °C) durante 15 días sin que la calidad del test se vea afectada.

Como ninguna prueba de análisis puede probar la ausencia de los virus VIH, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C o de cualquier otro agente infeccioso, el Control Hb A2 Normal debe ser manipulado con las precauciones habituales para evitar contaminarse.
Esta sangre control, analizada usando técnicas aceptadas por una autoridad competente (FDA, AFSSaPS…), es negativa :

- para la presencia del antígeno de superficie de la hepatitis B,
- para la presencia de anticuerpos anti-VHC,
- para la presencia de anticuerpos anti-VIH 1 y anti-VIH 2.

2. AGUA DESTILADA O DESIONIZADA

Uso

Para lavar los capilares del aparato automático para electroforesis capilar, CAPILLARYS, SEBIA.
Se recomienda usar agua destilada o desionizada filtrada (con un filtro de porosidad ≤ 0,45 µm).
Renueve el agua cada día para evitar contaminaciones microbianas. En caso de conservación prolongada, añada 35 µL/L de ProClin 300.

IMPORTANTE: Antes de llenar el contenedor de agua, se recomienda lavarlo con agua destilada o desionizada.

3. CAPICLEAN

Presentación

El vial de la solución enzimática concentrada CAPICLEAN (SEBIA, referencia nº 2058: 1 vial de 25 mL) contiene: enzimas proteolíticos, surfactantes y aditivos, inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

ATENCIÓN: La solución CAPICLEAN puede causar irritación o quemaduras cutáneas, oculares o de las mucosas.

Uso

Para la limpieza semanal de los capilares y la cánula de muestras del aparato automático para electroforesis capilar, CAPILLARYS, SEBIA.
Cuando use para ello segmentos de dilución de " 100 µL " específicos de la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E), dispense 50 µL de solución concentrada CAPICLEAN y 50 µL de agua destilada o desionizada a temperatura ambiente en cada cúpula del segmento de dilución, evitando la formación de espuma, y luego siga el procedimiento habitual.

Consulte las instrucciones de uso del CAPICLEAN, SEBIA.

IMPORTANTE: No reutilice el segmento de dilución usado para la limpieza de los capilares y la cánula.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

El CAPICLEAN debe conservarse en nevera (entre 2 y 8 °C). Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial. NO LO CONGELE.
Debe estar exento de precipitados. Deseche el CAPICLEAN si cambia de aspecto o aparece turbidez debido a contaminación microbiana.

4. SOLUCIÓN DE HIPOCLORITO DE SODIO (para la limpieza de la cánula de muestras)

Preparación

Prepare una solución de hipoclorito de sodio (lejía) de 9° clorométrica (entre 2 y 3 % de cloro) a partir de una dosis concentrada de 250 mL de 36° clorométrica (9,6 % de cloro) diluida hasta 1 litro (volumen final) con agua destilada o desionizada fría.

Uso

Para limpiar la cánula de muestras del aparato automático para electroforesis capilar, CAPILLARYS, SEBIA (mantenimiento semanal para eliminar cualquier proteína que se haya adsorbido a la cánula).

Consulte las instrucciones de uso del CAPILLARYS, SEBIA.

- Use el cargador de muestras específico para el mantenimiento (n° 100).
- Coloque en este cargador, en la posición 1, un tubo de hemólisis que contenga 2 mL de solución de hipoclorito de sodio preparada anteriormente.
- Introduzca el cargador n° 100 de mantenimiento en el sistema CAPILLARYS.
- En el menú de la ventana "MANTENIMIENTO" que aparece en pantalla, seleccione "Iniciar la limpieza de la cánula (solución de hipoclorito de sodio o solución de lavado CDT)", y luego confirme la selección.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

La solución de hipoclorito de sodio de 9° puede conservarse 3 meses a temperatura ambiente en un recipiente de plástico cerrado herméticamente, protegido de la luz solar y de cualquier fuente de calor o ignición, y alejado de los ácidos y el amoniaco.

5. SOLUCIÓN DE LAVADO CAPILLARYS

Preparación

El vial de la solución de lavado concentrada (SEBIA, referencia nº 2052: 2 viales de 75 mL) debe completarse hasta 750 mL con agua destilada o desionizada.

ATENCIÓN: La solución de lavado contiene sosa cáustica. Solución corrosiva. Provoca quemaduras graves. Consérvela lejos del alcance de los niños. En caso de contacto con los ojos, lávelos inmediatamente con agua en abundancia y consulte a un especialista. Quítese inmediatamente cualquier prenda manchada o salpicada. Use guantes adecuados y un aparato de protección ocular/facial.

Uso

Para lavar los capilares del CAPILLARYS. Reactivo adicional necesario en caso de realizar series inferiores a 40 análisis.

IMPORTANTE : Antes de llenar el contenedor de solución de lavado, se recomienda lavar con agua destilada o desionizada en abundancia el cuello del contenedor, el conector y el tubo para evitar la acumulación de sales.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

Las soluciones de lavado concentrada y diluida deben conservarse a temperatura ambiente o en nevera en contenedores cerrados para evitar la evaporación. La solución concentrada es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en la etiqueta del vial.
La solución diluida es estable durante 3 meses.
Deseche la solución de lavado diluida si cambia de aspecto o aparece turbidez debido a contaminación microbiana.

6. SALINA

Preparación

Solución de NaCl 0,15 M (9 g/L) en agua destilada o desionizada.

Uso

Para lavar los glóbulos rojos antes de conservarlos a - 80 °C, si es necesario.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

La solución salina puede conservarse a temperatura ambiente o en nevera.
Deseche la solución al cabo de 3 meses o si cambia de aspecto o aparece turbidez debido a contaminación microbiana. Para una conservación prolongada, añada 1 g/L de azida sódica.

EQUIPAMIENTO Y ACCESORIOS NECESARIOS

1. Sistema de electroforesis capilar CAPILLARYS SEBIA, referencias n° 1220 o n° 1222.
2. Cargadores de muestras, suministrados con el sistema CAPILLARYS.
3. Contenedores de plástico suministrados con el sistema CAPILLARYS: contenedor para la limpieza de los capilares (debe llenarse con agua destilada o desionizada), contenedor de solución de lavado y contenedor de desechos.

MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS

Extracción y conservación de las muestras

El análisis se realiza con sangres frescas, recogidas en anticoagulante (EDTA, citrato o heparina). No use anticoagulantes que contengan yodoacetato. Las sangres deben ser obtenidas según los métodos establecidos de uso en el laboratorio clínico.
Las sangres pueden conservarse un máximo de siete días en nevera (entre 2 y 8 °C).
Para conservaciones prolongadas, congele rápidamente las muestras a - 80 °C (como máximo durante las 8 horas siguientes a su obtención) después de haber lavado los glóbulos rojos según el procedimiento siguiente: centrifugue la sangre total, durante 5 minutos a 5.000 r.p.m.; elimine el plasma; lave 2 veces los glóbulos rojos con 10 volúmenes de salina (centrifugue después de cada lavado) y elimine el exceso de salina de la superficie del coágulo globular lavado; agite en el vórtex antes de congelarlo.
Las sangres congeladas a - 80 °C son estables un máximo de 3 meses.

IMPORTANTE: Para una conservación óptima de las muestras, no las conserve a - 20 °C sino a - 80 °C (vea la BIBLIOGRAFÍA: J Bardakdjian-Michau *et al*, 2003).

NOTA: No conserve las sangres a temperatura ambiente.

Las hemoglobinas (Hb) de las muestras conservadas entre 2 y 8 °C se degradan progresivamente.
En una muestra conservada más de 7 días en nevera:

- como consecuencia de la degradación de la muestra, aparece una fracción débil, correspondiente a metahemoglobina, en la zona de migración de la Hb S,
- en presencia de Hb C, aparece una fracción correspondiente a la Hb C degradada en posición anódica respecto a la Hb A2, pero sin ninguna interferencia con ésta (zona Z4, vea la tabla del párrafo " Interpretación "),
- en presencia de Hb O-Arab, aparece una fracción correspondiente a Hb O-Arab degradada en la zona de migración de la Hb S (zona Z5, vea la tabla, párrafo " Interpretación "),
- en presencia de Hb E, aparece una fracción correspondiente a Hb E degradada en la zona Z6 (vea la tabla del párrafo " Interpretación "),
- en presencia de Hb S, aparece una fracción correspondiente a Hb S degradada en la zona de migración de la Hb F (zona Z7, vea la tabla del párrafo " Interpretación "),
- en presencia de Hb A, aparece una fracción correspondiente a Hb A degradada en posición anódica respecto a la Hb A (zona Z11, vea la tabla del párrafo " Interpretación ").

En presencia de Hb F (en el caso de sangres de recién nacidos), aparece una fracción en la zona de migración de la Hb A (zona Z9, vea la tabla del párrafo " Interpretación ") como consecuencia de una degradación de la muestra.
Si la muestra se ha conservado más de 10 días en nevera, se observa la presencia de aglomerados viscosos en los glóbulos rojos: es indispensable eliminarlos antes de realizar el análisis.

Preparación de las muestras

- Deje sedimentar los glóbulos rojos de la sangre total durante varias horas en nevera (2 - 8 °C) o centrifugue la sangre total durante 5 minutos a 5.000 r.p.m.
- Elimine con cuidado el máximo de plasma (en las muestras recogidas en heparina, elimine los aglomerados viscosos presentes en la interfase plasma / glóbulos rojos).
- **Agite en el vórtex durante 5 segundos.**

IMPORTANTE: No use muestras que contengan una altura máxima de plasma residual superior a 3 mm; si hay más de 3 mm de plasma el análisis puede verse afectado.

Casos especiales: Análisis de muestras sin Hb A ó Hb A2 (estas muestras pueden ser cuantificadas pero no caracterizadas mediante las zonas de identificación).
Para identificar las fracciones de hemoglobina presentes en una muestra sin hemoglobina A o hemoglobina A2, se recomienda preparar la muestra siguiendo uno de los dos métodos siguientes:
Dilución automática:

- En un microtubo, mezcle un volumen (80 µL) de glóbulos rojos de la muestra a analizar y un volumen de Control Hb A2 Normal (80 µL).
- Agite en el vórtex durante 5 segundos.
- Corte el tapón del microtubo.
- Ponga el microtubo en un tubo de hemólisis nuevo que servirá de soporte y después colóquelo en un cargador de muestras del CAPILLARYS.
- Realice el análisis de la muestra siguiendo el procedimiento habitual.

Dilución manual:

- Mezcle directamente en los pocillos de un segmento de dilución verde nuevo, 9 µL de Control Hb A2 Normal reconstituido con 9 µL de la muestra a analizar y 90 µL de solución hemolizante CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E).
- Agite la mezcla mediante pipeteos sucesivos.
- Ponga este segmento en el cargador nº 0 del CAPILLARYS.
- Introduzca el cargador en el sistema CAPILLARYS, y luego seleccione en la ventana que aparece en pantalla la opción "Sample" en "dilución manual" y valide.

Los resultados obtenidos son entonces tenidos en cuenta automáticamente por el programa para el tratamiento de los datos.

IMPORTANTE: En una muestra sin Hb A ó Hb A2 preparada según estos dos métodos, la cuantificación de las fracciones indicada en el perfil electroforético no tiene ningún significado y los valores obtenidos no deben ser tenidos en cuenta; este procedimiento sólo permite la identificación de la o las variantes presentes en la muestra mediante las zonas de identificación, gracias a que migrarán en la zona correcta.
La cuantificación de las fracciones se obtiene en este caso analizando la muestra inicial no mezclada (antes de diluirla con la sangre control).

Muestras a descartar

- No use muestras de sangre total no sedimentadas.
- No use muestras de sangre antiguas o mal conservadas, ya que la hemólisis automática de las muestras puede ser perturbada por la presencia de aglomerados viscosos entre los glóbulos rojos; el perfil electroforético puede también ser afectado por los productos de degradación de las hemoglobinas (o por artefactos).

PROCEDIMIENTO

El sistema CAPILLARYS es un instrumento multiparamétrico automático que permite realizar el análisis de las hemoglobinas en 7 capilares en paralelo según las etapas siguientes:

- lectura de los códigos de barras de los tubos primarios (hasta 7) y del cargador;
- hemólisis y dilución de las muestras a partir de tubos primarios (sin plasma);
- lavado de los capilares;
- inyección de las muestras hemolizadas;
- separación y detección directa de las hemoglobinas en los capilares.

Las etapas manuales son las siguientes:

- colocación de los tubos primarios (destapados) en los cargadores, en las posiciones 1 a 7;
- colocación del tubo de solución hemolizante en la posición 8 del cargador;
- colocación de un segmento de dilución nuevo en el cargador;
- introducción en el sistema CAPILLARYS;
- recuperación de los cargadores después del análisis.

LEA DETENIDAMENTE EL MANUAL DE INSTRUCCIONES DEL CAPILLARYS.

I. PREPARACIÓN DEL ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO

1. Encienda el CAPILLARYS y el ordenador de control.
2. Abra el programa de gestión PHORESIS (CAPILLARYS) y valide el nivel de los reactivos, tras lo cual el aparato se iniciará automáticamente.
3. Use el kit CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) con el programa de análisis "HEMOGLOBIN(E)". Para seleccionar el programa de análisis "HEMOGLOBIN(E)" y conectar el contenedor de tampón CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) al aparato, lea detenidamente el manual de instrucciones del CAPILLARYS.
4. El cargador de muestras posee 8 posiciones para tubos. Coloque hasta 7 tubos primarios sin plasma en cada cargador (posiciones 1 a 7), destapando cada tubo y de forma que el código de barras de cada tubo quede encarado hacia la ventana de lectura del mismo.

   IMPORTANTE: Si el número de tubos que va a analizar es inferior a 7, complete el cargador poniendo tubos con agua destilada o desionizada.
5. Dispense 4 mL de solución hemolizante CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) en un tubo de hemólisis sin que se formen burbujas de aire, y coloque este tubo en la posición 8 del cargador de muestras.

   IMPORTANTE: Compruebe que no haya espuma en el tubo de solución hemolizante antes de colocarlo en el cargador.
6. Coloque un segmento de dilución nuevo en cada cargador (en caso de ausencia del segmento aparecerá un mensaje de advertencia).
7. Introduzca el (o los) cargador(es) completo(s) en el sistema CAPILLARYS por el orificio de entrada situado en medio del aparato. Se pueden introducir hasta trece cargadores a la vez, pudiéndose añadir nuevos cargadores de forma continua a medida que se vaya completando el análisis de los cargadores ya introducidos. Cuando quiera analizar una sangre control, use el cargador específico n° 0, previsto a este efecto.
8. Saque de la cinta de salida, situada a la izquierda del aparato, los cargadores ya analizados.
9. Coja con precaución el segmento de dilución usado y deséchelo.

   ATENCIÓN: Manipule con cuidado los segmentos de dilución que contengan muestras biológicas.

DILUCIÓN - MIGRACIÓN - DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS AUTOMÁTICAS

1. Lectura de los códigos de barras de los tubos primarios de muestra y del cargador.
2. Dilución de las sangres con la solución hemolizante, con limpieza de la cánula de muestras entre cada dilución.
3. Lavado de los capilares.
4. Inyección de las muestras diluidas en los capilares.
5. Migración a voltaje constante con temperatura controlada por efecto Peltier, durante unos 8 minutos.
6. Lectura a 415 nm y aparición simultánea del perfil de las hemoglobinas en la pantalla del ordenador.

NOTA: Estas etapas se realizan consecutivamente para el primer cargador introducido: los perfiles correspondientes a los tubos analizados se obtienen al cabo de unos 20 minutos. Para el cargador de muestras siguiente, las fases 1 y 2 (lectura de los códigos de barras y hemólisis de las sangres) se realizan durante la etapa 5 (migración) del cargador anterior.

II. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Al final del análisis se realiza automáticamente la cuantificación relativa de las fracciones y los perfiles pueden ser interpretados. Los picos de hemoglobina A (Hb A), F (Hb F) y A2 (Hb A2) son identificados de forma automática y el pico de Hb A es situado en el centro de la ventana de edición de las curvas. Los perfiles electroforéticos obtenidos deben ser analizados visualmente para detectar las anomalías.
Las posiciones potenciales de las diferentes variantes de la hemoglobina (identificadas por las zonas Z1 a Z15) se muestran en la ventana de edición y aparecen en el informe de resultados. La tabla del párrafo "Interpretación" presenta las variantes conocidas que pueden estar presentes en cada zona.
Cuando el programa identifica una fracción de hemoglobina en una zona determinada, el nombre de esa zona es enmarcado.

Los perfiles son centrados automáticamente respecto al pico de Hb A para facilitar su interpretación:

- en caso de ausencia de detección de los picos de Hb A y / o Hb A2 en un perfil, aparece un símbolo de alerta amarillo, y el centrado del perfil se realiza entonces usando la posición del pico de Hb A de los dos últimos perfiles obtenidos anteriormente en el mismo capilar, y ningún pico es identificado (excepto cuando se detecta Hb C: en este caso, los picos de Hb A2 y de Hb C son identificados) ;

- en caso de presencia de Hb F en un perfil, sin detección de Hb A, el símbolo amarillo de alerta no aparece, y el centrado del perfil se realiza entonces respecto a la posición del pico de Hb F y los picos de Hb F y / o Hb A y / o Hb A2 son identificados ;
- en caso de imposibilidad de centrado del perfil, aparece un símbolo rojo de alerta y los picos de Hb F y de Hb A2 no son identificados (en este caso, contacte con el Servicio de Asistencia Técnica de SEBIA).

En estos tres casos, las diferentes zonas de variantes (Z1 a Z15) no aparecen ni el la ventana de edición ni en el informe de resultados.
En el perfil electroforético, las curvas de las hemoglobinas A2 y C, calculadas por triangulación, son redibujadas (o ajustadas) y superpuestas a la curva nativa. Esta representación permite la cuantificación de la fracción Hb A2 en presencia de Hb C.

ATENCIÓN: En algunos casos de hemoglobina C (homozigosis) o debido a un problema técnico, las fracciones de Hb A2 y Hb C no son ajustadas, lo que implica una infravaloración de estas fracciones. Se recomienda entonces cuantificar la fracción Hb A2 usando otra técnica.

LEA DETENIDAMENTE EL MANUAL DE INSTRUCCIONES DEL CAPILLARYS.

III. FIN DE LA SECUENCIA DE ANÁLISIS

El usuario debe realizar el procedimiento de extinción al final de la sesión de trabajo para conservar los capilares en condiciones óptimas.

IV. LLENADO DE LOS CONTENEDORES DE REACTIVO

El aparato automático CAPILLARYS permite una gestión automática de los reactivos.

IMPORTANTE: Es necesario seguir el procedimiento previsto para el cambio de los contenedores de reactivo (si no se hace correctamente los contenedores pueden despresurizarse y los análisis pueden verse afectados) y respetar el código de colores contenedor - conector en cada cambio de contenedor.

La aparición de la ventana de gestión de los reactivos indica que es necesario cambiar uno o varios reactivos:

- colocar un nuevo contendor de tampón de análisis y/o,
- llenar el contenedor de lavado con la solución de lavado reconstituida y/o,
- llenar el contenedor de limpieza con agua destilada o desionizada filtrada y/o,
- vaciar el contenedor de desechos.

ATENCIÓN : No use agua destilada o desionizada comercial, como por ejemplo el agua para planchar (riesgo de deterioro importante de los capilares). Use exclusivamente agua de calidad ultrapura, como el agua para inyección.

IMPORTANTE: Se recomienda lavar con agua destilada o desionizada en abundancia el contenedor de limpieza antes de llenarlo.

Consulte el manual de instrucciones del CAPILLARYS.

CONTROL DE CALIDAD

Después de cada cambio de lote del tampón de análisis o de modo de trabajo, o después de un ciclo de limpieza de los capilares con CAPICLEAN, **y antes de iniciar una nueva serie de análisis**, es necesario realizar dos series de análisis con el Control Hb A2 Normal, SEBIA, referencia nº 4778, usando el cargador nº 0 específico previsto a este efecto (vea el capítulo REACTIVOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS).
También se recomienda incluir una sangre de control en cada serie de análisis (por ejemplo, una muestra de control que contenga las hemoglobinas A, F, S y C, como el Control Hb AFSC, SEBIA, referencia nº 4792, o una sangre normal, el Control Hb A2 Normal, SEBIA, referencia nº 4778, o el Control Hb A2 Patológico, SEBIA, referencia nº 4779).

RESULTADOS

Valores

La detección directa en el capilar a 415 nm permite definir las concentraciones relativas (porcentajes) de cada fracción.
Los valores normales de cada fracción de hemoglobina han sido establecidos a partir de una población de 113 adultos (hombres y mujeres) en buen estado de salud, que presentan valores normales en HPLC:

Hemoglobina A: comprendida entre 96,8 y 97,8 %
Hemoglobina F: < 0,5 % (*)
Hemoglobina A2: comprendida entre 2,2 y 3,2 %

(*) Vea Interferencias y limitaciones

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores normales.

NOTA: Los valores normales han sido obtenidos con los parámetros de integración por defecto del programa (alisado 0 e integración automática de las fracciones de la hemoglobina con la técnica HEMOGLOBIN(E)).

ATENCIÓN: Los valores normales (valores de referencia) sólo deben ser tenidos en cuenta en ausencia de variantes de la hemoglobina.

Interpretación

Vea PERFILES ELECTROFORÉTICOS, figuras 1 - 15.

Las diferentes zonas de migración de las variantes (identificadas como Z1 a Z15) aparecen en la ventana de edición de las curvas y en el informe de resultados. Al pasar el cursor del ratón sobre el nombre de una zona aparece una burbuja informativa que indica las variantes posibles de la hemoglobina que migran en esa zona.
Para cada fracción, la posición del máximo define la zona de migración.
Vea la tabla que muestra las variantes potenciales presentes en cada zona.

ATENCIÓN: La graduación del eje de abscisas no puede en ningún caso usarse para la identificación de una variante de la hemoglobina.

1. Anomalías cualitativas: Hemoglobinopatías

La mayoría son anomalías estructurales, debidas a una sustitución por mutación de un aminoácido por otro en una de las cadenas. Las consecuencias de la mutación varían en función de la posición del aminoácido mutado y del que le remplaza, siendo particularmente necesaria la integridad de algunas partes de la molécula para que sea viable y funcione correctamente.
Se han definido y descrito más de 900 variantes de la hemoglobina adulta. Las primeras hemoglobinas anormales estudiadas, y las más numerosas, son debidas a una modificación de la carga eléctrica global de la molécula, lo que permite detectarlas fácilmente por electroforesis.
Cinco hemoglobinas anormales principales presentan un interés particular desde un punto de vista antropológico y médico: S, C, E, O-Arab y D.
El kit CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) está destinado a la detección de las hemoglobinopatías y las talasemias.

Hemoglobina S

Es la variante más frecuente, y es debida a una sustitución por mutación de un ácido glutámico de la cadena ß (aminoácido ácido) por una valina (aminoácido neutro): presenta pues un punto isoeléctrico aumentado respecto a la hemoglobina A. Su carga negativa global está por tanto disminuida en el pH de análisis: esta hemoglobina migra más rápidamente que la hemoglobina A. En la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E), en tampón alcalino, la hemoglobina S migra entre las fracciones A y A2, a más o menos 1/3 de la distancia A - A2, de lado de la A2.

Hemoglobina C

La mutación es debida a un ácido glutámico de la cadena ß sustituido por una lisina (aminoácido alcalino): presenta pues un punto isoeléctrico aumentado respecto a la hemoglobina A. Su carga negativa global está por tanto disminuida en el pH del análisis: esta hemoglobina migra más rápidamente que las hemoglobinas A y A2, de las que está parcialmente separada, lo que mejora netamente el diagnóstico médico.
Además, las hemoglobinas C, E, y O-Arab no se superponen en el perfil electroforético y pueden por tanto ser distinguidas fácilmente.

Hemoglobina E

Un ácido glutámico de la cadena ß está sustituido por una lisina. En la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E), la hemoglobina E migra justo después de la hemoglobina A2, de la que está totalmente separada. En presencia de la hemoglobina E, la fracción A2 puede por tanto ser cuantificada para detectar una b talasemia.

Hemoglobina O-Arab

Un ácido glutámico de la cadena ß está sustituido por una lisina. En la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E), la hemoglobina O-Arab migra con la fracción A2. En este caso, la cuantificación de la hemoglobina A2 es imposible. Cuando esta fracción es superior a un 9 %, puede sospecharse la presencia de la hemoglobina O-Arab. Esta última no puede ser confundida con las hemoglobinas C y E, ya que éstas están separadas de la fracción A2.

Hemoglobina D

Un ácido glutámico de la cadena ß está sustituido por una glutamina. En la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E), la hemoglobina D (denominada D-Punjab, D-Los Angeles, D-Chicago ó D-Portugal) migra en posición anódica respecto a la hemoglobina S, lo que permite distinguirla de ésta.

2. Anomalías cuantitativas: Talasemias

Constituyen un grupo bastante heterogéneo de afecciones genéticas caracterizadas por la reducción de la tasa de síntesis de una o varias cadenas de la hemoglobina. El mecanismo de esta reducción a escala molecular todavía no es bien conocido.
Existen diferentes síndromes talasémicos:

Alfa talasemias

Se caracterizan por la disminución de la síntesis de las cadenas α, afectando por consiguiente a la síntesis de las 3 hemoglobinas fisiológicas. El exceso de síntesis de las cadenas ß y γ respecto a las cadenas a provoca la formación de tetrámeros sin cadenas α:

- Hemoglobina Bart = γ 4,
- Hemoglobina H = ß 4.

La hemoglobina H posee un punto isoeléctrico relativamente bajo. En la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E), migra en una posición mucho más anódica que la hemoglobina A (y puede estar presente en forma de una o varias fracciones).

Beta-talasemias

Se caracterizan por la disminución de la síntesis de las cadenas ß. Sólo se ve afectada la síntesis de la hemoglobina A.
Les porcentajes de las hemoglobinas F y A2 están por tanto aumentados respecto a la hemoglobina A. En la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E), los valores de las diferentes hemoglobinas normales obtenidos permiten detectar los casos de beta talasemias.

3. Notas

- En caso de ausencia de la hemoglobina A, se puede observar una fracción débil en la zona de migración de esta última. Se trata de una hemoglobina F acetilada que representa de un 15 a un 25 % de la hemoglobina F. El sistema CAPILLARYS está programado automáticamente para evitar confundir esta fracción acetilada con la hemoglobina A.
- Puede sospecharse la presencia de una variante de la hemoglobina A2 si una fracción que presenta un porcentaje débil (de 0,5 a 3 %) es observada en una zona de migración comprendida entre la hemoglobina F y la hemoglobina δA'2 (variante de la A2), incluso dentro de las zonas de migración habituales de las hemoglobinas.
- Si está presente una variante de la hemoglobina A2 (δA'2 o cualquier otra variante de la A2), se recomienda sumar el porcentaje de esta variante al de la hemoglobina A2 para un mejor diagnóstico de las beta-talasemias.
- Algunas variantes de la hemoglobina (Hb Camperdown y Hb Okayama, por ejemplo) migran muy cerca de la Hb A y pueden ser confundidas con esta última.
- Algunas variantes de la hemoglobina (Hb Porto-Alegre y Hb S degradada) migran muy cerca de la Hb F y pueden ser confundidas con esta última.
- Las fracciones débiles que migran en la zona Z12 son a veces mal integradas (Hb Bart demasiado asimétricas, por ejemplo). Es necesario entonces suprimir la integración automática e integrarlas manualmente.

- Al analizar sangres de recién nacidos, las muestras que contengan Hb F en concentraciones elevadas pueden presentar una fracción Hb A perturbada, especialmente a causa de la migración de la Hb F degradada en esta zona. El porcentaje de Hb A indicado por el programa puede estar entonces sobreestimado. Además, en caso de presencia de variantes de la hemoglobina (> 4 %; S, C, E ó D-Punjab por ejemplo) en una sangre que contenga una concentración elevada de Hb F (> 60 %), es necesario realizar análisis complementarios para confirmar la presencia Hb A.
- En los recién nacidos hasta la edad de 6 - 9 meses, se recomienda analizar varias muestras (por ejemplo, obtenidas mensualmente) para controlar la concentración de Hb F. Esto permitirá comprobar la disminución de Hb F y la eventual presencia de una variante. En caso de duda, se aconseja confirmar el resultado con una técnica complementaria y realizar un análisis a los padres.
- Caso en que la hemoglobina F (Hb F) puede estar aumentada (excepto en los recién nacidos):
  - en caso de embarazo;
  - pacientes con drepanocitosis con más de 2 años de edad, tratados con Hydrea® (hidroxicarbamida) y / o transfusionados y / o que presenten naturalmente una cantidad incrementada de Hb F debido a un fenómeno de compensación;
  - pacientes con más de 2 años de edad con el desorden PHHF (persistencia hereditaria de Hb F: hay entre un 20 y un 40 % de Hb F en los heterocigotos);
  - pacientes con más de 2 años de edad que presenten leucemia (de cualquier tipo), anemia hemolítica hereditaria, diabetes, enfermedad tiroidea, hiperactividad de la médula ósea, mieloma múltiple, o un cáncer en fase de metástasis.

  Si desea obtener más información, visite la página web http://www.answers.com/topic/fetal-hemoglobin-test.
- Al analizar sangres de pacientes con drepanocitosis (anemia falciforme) que hayan recibido transfusiones y que presenten un porcentaje bajo de Hb A (< 10 %), la fracción Hb S puede aparecer desplazada de la zona Z5 hacia la zona Z6. Es indispensable confrontar este resultado con el análisis hematológico y realizar análisis complementarios para confirmar la presencia de Hb S.

Interferencias y limitaciones

- Vea MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS.
- No use muestras de sangre total no sedimentada.
- No use muestras de sangre hemolizada.
- No use muestras de sangre antiguas o mal conservadas, ya que la presencia de hemoglobinas degradadas puede observarse en el perfil electroforético en forma de artefactos más o menos numerosos después de 7 días de conservación.
- Si las muestras se han conservado más de 10 días, se observa la presencia de aglomerados viscosos en los glóbulos rojos: es indispensable eliminarlos antes de realizar el análisis.
- Cuando se detecta la presencia de una hemoglobina anormal, se recomienda usar otras técnicas de identificación (por ejemplo, electroforesis de las cadenas de globina) o consultar a un laboratorio especializado para un tipaje preciso de la variante.

  IMPORTANTE: Es indispensable realizar el análisis hematológico como resultado complementario.
- La migración de una variante de la hemoglobina con una movilidad muy cercana a la fracción Hb A implica una subestimación de la fracción Hb A y de la variante, por lo que se produce una sobrestimación de la fracción Hb A2. Para obtener una cuantificación correcta de la fracción Hb A2, es necesario eliminar la integración de los picos de la variante y de la Hb A, para integrar conjuntamente esos 2 picos a continuación.
- Las muestras de algunos pacientes que presentan una hemoglobina S homozigota y son tratados con Hydrea® (hidroxicarbamida), pueden presentar una hemoglobina F cuya síntesis ha sido inducida por el tratamiento. En la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E), no se han observado diferencias netas de movilidad entre esta hemoglobina F inducida y la hemoglobina F nativa.
- Teniendo en cuenta los principios analíticos de las técnicas actuales (principios de la electroforesis de zona, resolución), no hay garantías en cuanto a la detección total de todas las variantes de la hemoglobina.

Resolución de problemas

Contacte con el Servicio de Asistencia Técnica de SEBIA en caso de que el análisis sea defectuoso.
Las fichas de datos de seguridad de los diferentes reactivos del kit, así como las informaciones relativas a la eliminación de los desechos, están disponibles en el Servicio de Asistencia Técnica de SEBIA.

CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

Los resultados siguientes, obtenidos con el kit CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) en el sistema CAPILLARYS mediante análisis cuantitativo, indican una muy buena repetibilidad y reproducibilidad del kit CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) en todos los aspectos probados, con un coeficiente de variación medio del orden del 1,7 % en los porcentajes de cada fracción de hemoglobina estudiada. Además, los perfiles electroforéticos han sido interpretados cualitativamente a simple vista.
Los porcentajes de las diferentes fracciones han sido obtenidos con los parámetros de integración por defecto del programa (alisado 0 e integración automática de las fracciones de hemoglobina con la técnica HEMOGLOBIN(E)).

Repetibilidad intraserial

Se analizaron cinco sangres diferentes (sangre A normal, sangre B con Hb A2 aumentada, sangres C y E con Hb F y sangre F con Hb A2 aumentada con Hb F y S) en el sistema CAPILLARYS con el kit CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) y 2 lotes diferentes de tampón de análisis. Cada sangre se analizó simultáneamente en los 7 capilares del sistema CAPILLARYS. Se calcularon las medias, desviaciones típicas (SD) y coeficientes de variación (CV) (n = 7) de cada muestra con cada lote de tampón.
Le tabla siguiente presenta los valores medios (en %), desviaciones típicas (SD) y coeficientes de variación (CV) obtenidos para cada fracción de hemoglobina de las 5 sangres analizadas.

NOTA: No se ha detectado ninguna discordancia en ninguna de las muestras :

- *Muestra con valor normal de Hb A2: todos los valores son normales;*
- *Muestras con valores aumentados de Hb A2: todos los valores están aumentados;*
- *Muestras con hemoglobinas anormales: se han detectado todas las hemoglobinas anormales.*

Fracción de hemoglobina	Hb A	Hb A2	Hb F	Hb S
Sangre A : lote nº 1 / lote nº 2				
MEDIA (%)	97,3 / 97,3	2,7 / 2,7	/	/
SD	0,05 / 0,05	0,05 / 0,05	/	/
CV (%)	0,1 / 0,1	1,8 / 1,8	/	/
Sangre B : lote nº 1 / lote nº 2				
MEDIA (%)	94,3 / 94,5	5,7 / 5,5	/	/
SD	0,06 / 0,08	0,06 / 0,08	/	/
CV (%)	0,1 / 0,1	1,1 / 1,5	/	/
Sangre C : lote nº 1 / lote nº 2				
MEDIA (%)	80,5 / 80,4	2,3 / 2,3	17,2 / 17,3	/
SD	0,14 / 0,12	0,00 / 0,05	0,14 / 0,08	/
CV (%)	0,2 / 0,1	0,0 / 2,0	0,8 / 0,5	/
Sangre E : lote nº 1 / lote nº 2				
MEDIA (%)	96,8 / 96,9	2,4 / 2,3	0,8 / 0,8	/
SD	0,09 / 0,11	0,05 / 0,03	0,05 / 0,08	/
CV (%)	0,1 / 0,1	1,9 / 1,5	6,7 / 10,2	/
Sangre F : lote nº 1 / lote nº 2				
MEDIA (%)	53,4 / 53,7	5,0 / 4,9	9,0 / 8,8	32,6 / 32,6
SD	0,17 / 0,24	0,05 / 0,07	0,05 / 0,07	0,17 / 0,20
CV (%)	0,3 / 0,4	1,1 / 1,4	0,6 / 0,8	0,5 / 0,6

Reproducibilidad interserial

Se analizaron ocho sangres en el sistema CAPILLARYS con el kit CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E). Entre las muestras analizadas hay 4 muestras con un valor de Hb A2 normal, y 4 muestras con hemoglobinas anormales (Hb F o Hb S) entre las que hay 1 sangre con la Hb A2 aumentada. Estas sangres se analizaron simultáneamente en todos los capilares del sistema CAPILLARYS, y este análisis se repitió 10 veces con 3 lotes de tampón de análisis. Se calcularon las medias, desviaciones típicas (SD) y coeficientes de variación (CV) (n = 10) de cada muestra, de cada fracción de hemoglobina y de cada lote.
La tabla siguiente presenta los límites de los valores medios, SD y CV (%) obtenidos para las 8 muestras analizadas, y un coeficiente de variación medio calculado a partir de todos los coeficientes de variación (n = 24).

FRACCIÓN Hb	MEDIA (%)	SD	CV (%)	CV MEDIO (%)
Hb A	53,1 - 97,3	0,00 - 0,65	0,0 - 1,1	0,3
Hb A2	2,4 - 5,0	0,00 - 0,10	0,0 - 2,7	1,5
Hb F	0,7 - 8,7	0,04 - 0,07	0,7 - 8,8	4,5
Hb S	30,8 - 42,7	0,19 - 0,63	0,5 - 1,6	0,9

Reproducibilidad interlotes

Se analizaron ocho sangres (idénticas a las del estudio de reproducibilidad interserial) en el sistema CAPILLARYS con el kit CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) y 3 lotes de tampón de análisis. Estas sangres se analizaron simultáneamente en todos los capilares del sistema CAPILLARYS, y el análisis se repitió 10 veces con cada lote. Se calcularon las medias, desviaciones típicas (SD) y coeficientes de variación (CV) (n = 30) de cada muestra.
La tabla siguiente presenta los límites de los valores medios, SD y CV (%) obtenidos para las 8 muestras analizadas con los 3 lotes de tampón de análisis, y un coeficiente de variación medio calculado a partir de todos los coeficientes de variación (n = 3).

FRACCIÓN Hb	MEDIA (%)	SD	CV (%)	CV MEDIO (%)
Hb A	53,2 - 97,3	0,04 - 0,77	0,04 - 1,4	0,5
Hb A2	2,4 - 5,0	0,03 - 0,09	1,0 - 2,2	1,8
Hb F	0,7 - 8,6	0,06 - 0,08	0,9 - 8,5	4,9
Hb S	31,1 - 42,0	0,29 - 0,71	0,9 - 1,7	1,3

NOTA: No se ha detectado ninguna discordancia en los análisis de reproducibilidad interserial e interlotes en ninguna de las muestras:

- *Muestra con valor normal de Hb A2: todos los valores son normales;*
- *Muestra con valor aumentado de Hb A2: todos los valores están aumentados;*
- *Muestras con hemoglobinas anormales: se detectan todas las hemoglobinas anormales.*

Linealidad

El análisis de una mezcla de dos muestras diferentes en proporciones variables ha mostrado que el porcentaje de cada fracción de hemoglobina estudiada correlaciona perfectamente con la proporción de cada una de las fracciones en la mezcla, y que toda variación es detectada de forma lineal en la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E).
Además, el análisis de dos sangres características diferentes provenientes de pacientes con anemia, diluidas en serie con salina, ha mostrado que la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) es perfectamente lineal en la gama de concentraciones estudiadas, entre 2,1 y 12,6 g/dL, y que los porcentajes de las fracciones de hemoglobina son independientes de la concentración de hemoglobina.

Linealidad (estudio nº 2 con Hb F)

El análisis de una mezcla en proporciones variables de dos muestras diferentes de sangres de cordón umbilical (una con 15,9 g/dL de hemoglobina y un 88,2 % de Hb F, y la otra con 25,4 g/dL y un 81,6 % de Hb F) con una sangre de control normal, ha mostrado que el porcentaje de cada fracción de la hemoglobina estudiada (Hb A, Hb A2 y Hb F) está perfectamente correlacionado con la proporción de cada una de las fracciones en esa mezcla y que todas las variaciones son detectadas de manera lineal en la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E).
La técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) es perfectamente lineal en la gama de concentraciones estudiadas para la Hb F hasta un máximo del orden de 20,7 g/dL (entre 0 y 88 % de Hb F).

Linealidad (estudio n ° 3 con Hb A2)

El análisis de una mezcla en proporciones variables de dos muestras diferentes de sangre (una con 14,3 g/dL de hemoglobina y un 0,1 % de Hb A2 y la otra con 13,7 g/dL de hemoglobina y un 9,5 % de Hb A2) ha mostrado que el porcentaje de cada fracción de la hemoglobina estudiada (Hb A y Hb A2) está perfectamente correlacionado con la proporción de cada una de las fracciones de esa mezcla y que cualquier variación es detectada de forma lineal con la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E).
La técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) es perfectamente lineal en la gama de concentraciones de Hb A2 estudiadas hasta un máximo del orden de 1,3 g/dL (entre 0,1 y 9,5 % de Hb A2).

Exactitud

NOTA: Las muestras usadas en los tres estudios de exactitud que aparecen a continuación han sido suministradas por un centro hospitalario acompañadas de su diagnóstico clínico, establecido usando HPLC y/o electroforesis en gel alcalino y en gel ácido.

Determinación cuantitativa de Hb A2

Se analizaron sesenta y seis muestras de sangre que presentaban valores normales o elevados de Hb A2 en paralelo con la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) y con un sistema comercial de cuantificación de la hemoglobina A2 mediante HPLC.
Los resultados obtenidos mostraron una correlación perfecta entre los dos sistemas con, respecto a la cuantificación de la hemoglobina A2, una sensibilidad del 88,9 % y una especificidad del 95,8 % respecto a la técnica de referencia, calculadas según el método recomendado (Wendling, 1986).
La correlación entre estas dos técnicas respecto al valor de Hb A2 se determinó usando herramientas estadísticas: media y coeficiente de regresión lineal. Los parámetros de correlación entre estos 2 sistemas de análisis (y = CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E)) se muestran en la tabla siguiente:

Fracción	Coeficiente de correlación	Punto de corte en y	Pendiente	Límites de los valores en % CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E)
Hb A2	0,947	0,146	0,908	1,6 - 6,0

Determinación cuantitativa de la Hb F

Se analizaron setenta y cuatro muestras de sangre que presentaban valores normales o elevados de Hb F en paralelo con la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) y con un sistema comercial de cuantificación de la hemoglobina F mediante HPLC.
La correlación entre estas dos técnicas respecto al valor de Hb F se determinó usando herramientas estadísticas: media y coeficiente de regresión. Los parámetros de correlación entre estos 2 sistemas de análisis (y = CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E)) se muestran en la tabla siguiente:

Fracción	Coeficiente de correlación	Punto de corte en y	Pendiente	Límites de los valores en % CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E)
Hb F	0,995	-0,339	0,968	0,0 - 44,9

Determinación cuantitativa de la Hb S

Se analizaron cuarenta y tres muestras de sangre con hemoglobina S en paralelo con la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) y un sistema comercial de cuantificación de la hemoglobina S mediante HPLC.
La correlación entre estas dos técnicas respecto al valor de Hb S se determinó usando herramientas estadísticas: media y coeficiente de regresión lineal. Los parámetros de correlación entre estos 2 sistemas de análisis (y = CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E)) se muestran en la tabla siguiente:

Fracción	Coeficiente de correlación	Punto de corte en y	Pendiente	Límites de los valores en % CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E)
Hb S	0,994	1,769	0,005	9,1 - 92,7

Detección de hemoglobinas anormales

Se analizaron setenta y cinco muestras de sangre que presentaban diferentes variantes de la hemoglobina, como las hemoglobinas S, C y E, en paralelo con la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) y un sistema comercial de análisis de las hemoglobinas mediante HPLC.
Los resultados obtenidos mostraron una correlación perfecta entre los dos sistemas con, respecto a la detección de hemoglobinas anormales, una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 100 % respecto a la técnica de referencia, calculadas según el método recomendado (Wendling, 1986).
En efecto, todas las hemoglobinas anormales, así como los valores normales de hemoglobinas normales se detectaron usando la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E), concordando con la técnica de HPLC con la que se comparaba, los resultados hospitalarios y el diagnóstico clínico.
No se ha detectado ninguna discordancia entre las técnicas sea cual sea la muestra, como la presencia de falsos positivos (detección de una Hb anormal inexistente o de una Hb con valor normal detectada como valor anormal).

BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAPHY

1. J. Bardakdjian-Michau, J.-L. Dhondt, R. Ducrocq, F. Galactéros, A. Guyard, F.-X. Huchet, A. Lahary, D. Lena-Russo, P. Maboudou, M.-L. North, C. Prehu, A.-M. Soummer, M. Verschelde, H. Wajcman (2003) Bonnes pratiques de l'étude de l'hémoglobine. *Ann. Biol. Clin.*, 61, 401-409.
2. V.F. Fairbanks, ed. (1980) Hemoglobinopathies and thalassemia: Laboratory methods and case studies. Brian C. Decker, New York.
3. F. Galacteros (1986) Thalassémie, drépanocytose et autres hémoglobinopathies. *Techniques et Biologie*, 3, 174-178.
4. JM Hempe, JN Granger and RD Craver (1997) Capillary isoelectric focusing of hemoglobin variants. *Electrophoresis,* 18, 1785-1795.
5. T.H.J. Huisman and J.H.P. Jonxis (1977) The hemoglobinopathies: techniques of identification. Marcel Dekker, New York.
6. Jellum E *et al.* Diagnostic applications of chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.* B, 689, 155-164 (1997).
7. Joutovsky A, Hadzi-Nesic J and Nardi MA (2004) HPLC retention time as a diagnostic tool for hemoglobin variants and hemoglobinopathies : a study of 60 000 samples in a clinical diagnostic laboratories. *Clin. Chem.*, 50, 10, 1736-1747.
8. J.S. Krauss, P.A. Drew, M.H. Jonah, M. Trinh, S. Shell, L. Black and C.R. Baisden (1986) Densitometry and microchromatography compared for determination of the hemoglobin C and A2 proportions in hemoglobin C and hemoglobin SC disease and in hemoglobin C trait. *Clin. Chem.* 32, 5, 860-863.
9. Landers JP. Clinical Capillary Electrophoresis. *Clin. Chem.*, 41, 495-509 (1995).
10. C. Livingstone (1986) The hemoglobinopathies. Edit. London.-
11. M. Maier-Redelsberger, R. Girot (1989) Diagnostic biologique des maladies de l'hémoglobine. *Feuillets de biologie*, 170.
12. Oda RP *et al.* Capillary electrophoresis as a clinical tool for the analysis of protein in serum and other body fluids. *Electrophoresis*, 18, 1715-1723 (1997).
13. R.G. Schneider (1978) Methods for detection of hemoglobin variants and hemoglobinopathies in the routine clinical laboratory. CRC *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 9, 243-271.
14. L. Vovan, D. Lara-Russo, A. Orsini (1985) Diagnostic biologique des hémoglobinoses. *Ann. Pédiat.* 32, 9, 780-789.
15. http://globin.cse.psu.edu/hbvar/menu.html : Hbvar : A Database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemias.
16. Wendling A. Procédures de diagnostic ou de dépistage : Justification et validité d'un test de diagnostic ou de dépistage-sensibilité-spécificité. *Impact-Internat,* 1986 ; Sept : 93-97.

TABLEAU / TABLE

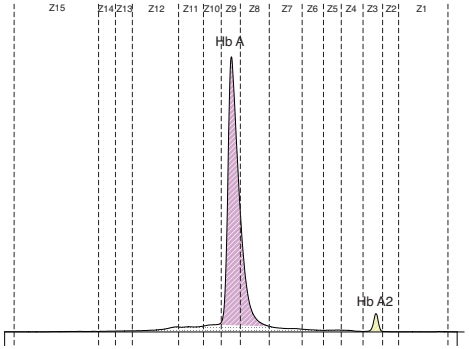
VARIANTS POTENTIELS PRÉSENTS DANS CHAQUE ZONE - POTENTIAL VARIANTS LOCATED IN EACH ZONE

Zone	Hémoglobines / Hemoglobins (Hb)
Z1	Hb δA'2, Hb αA2, variants de Hb A2 "Hasharon", de Hb A2 "Winnipeg", de Hb A2 "Q-India" et de Hb A2 "Q-Thailand", autres variants de Hb A2
	Hb δA'2, Hb αA2, "Hasharon" Hb A2 variant, "Winnipeg" Hb A2 variant, "Q-India" Hb A2 variant, "Q-Thailand" Hb A2 variant, other Hb A2 variants
Z2	Hb C, Hb Constant Spring, variant de Hb A2 "Setif"
	Hb C, Hb Constant Spring, "Setif" Hb A2 variant
Z3	Hb A2, Hb O-Arab
	Hb A2, Hb O-Arab
Z4	Hb E, Hb Köln, variant de Hb A2 "M-Iwate", variants de Hb A2, Hb C dégradée
	Hb E, Hb Köln, "M-Iwate" Hb A2 variant, Hb A2 variants, denatured Hb C
Z5	Hb S, Hb Hasharon, Hb Handsworth, Hb O-Arab dégradée
	Hb S, Hb Hasharon, Hb Handsworth, denatured Hb O-Arab
Z6	Hb D-Punjab (D-Los Angeles), Hb Stanleyville II, Hb Osu Christiansborg, Hb D-Ouled Rabah, Hb Lepore (Lepore-BW), Hb G-Philadelphie, Hb Q-India, Hb Q-Iran, Hb Korle-Bu (G-Accra), Hb Köln, Hb G-Taipei, Hb Winnipeg, Hb D-Iran, Hb Setif, Hb P-Nilotic, variant de Hb A2 "J-Toronto", variant de Hb A2 "J-Rovigo", Hb E dégradée
	Hb D-Punjab (D-Los Angeles), Hb Stanleyville II, Hb Osu Christiansborg, Hb D-Ouled Rabah, Hb Lepore (Lepore-BW), Hb G-Philadelphia, Hb Q-India, Hb Q-Iran, Hb Korle-Bu (G-Accra), Hb Köln, Hb G-Taipei, Hb Winnipeg, Hb D-Iran, Hb Setif, Hb P-Nilotic, "J-Toronto" Hb A2 variant, "J-Rovigo" Hb A2 variant, denatured Hb E
Z7	Hb F, Hb Q-Thailand (G-Taichung), Hb Richmond, Hb G-San José, Hb Geldrop Santa Anna, Hb Porto-Alegre, Hb Presbyterian, Hb S dégradée
	Hb F, Hb Q-Thailand (G-Taichung), Hb Richmond, Hb G-San Jose, Hb Geldrop Santa Anna, Hb Porto-Alegre, Hb Presbyterian, denatured Hb S
Z8	Hb F acétylée, Hb Atlanta, Hb Athens-GA (Waco)
	Acetylated Hb F, Hb Atlanta, Hb Athens-GA (Waco)
Z9	Hb A, Hb Phnom Penh, Hb Toulon, Hb Okayama, Hb Fontainebleau, Hb Raleigh, Hb Hekinan, Hb Mosella, Hb Dallas, Hb Aztec, Hb Little Rock, Hb Frankfurt, Hb Camperdown
	Hb A, Hb Phnom Penh, Hb Toulon, Hb Okayama, Hb Fontainebleau, Hb Raleigh, Hb Hekinan, Hb Mosella, Hb Dallas, Hb Aztec, Hb Little Rock, Hb Frankfurt, Hb Camperdown
Z10	Hb Hope, Hb M-Iwate
	Hb Hope, Hb M-Iwate
Z11	Hb A dégradée, Hb Kaohsiung (New York), Hb Himeji
	Denatured Hb A, Hb Kaohsiung (New York), Hb Himeji
Z12	Hb Bart, Hb J-Providence, Hb J-Broussais, Hb J-Toronto, Hb Ube-2, Hb J-Meinung (J-Bangkok), Hb J-Mexico, Hb J-Baltimore
	Hb Bart's, Hb J-Providence, Hb J-Broussais, Hb J-Toronto, Hb Ube-2, Hb J-Meinung (J-Bangkok), Hb J-Mexico, Hb J-Baltimore
Z13	Hb J-Rovigo, Hb N-Baltimore
	Hb J-Rovigo, Hb N-Baltimore
Z15	Hb H
	Hb H

SCHÉMAS / FIGURES

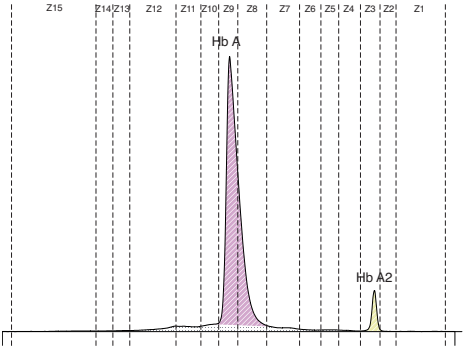
PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES - ELECTROPHORETIC PATTERNS

Figure 1



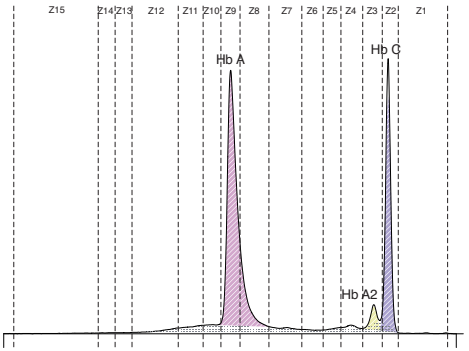
Sang normal
Normal blood sample

Figure 2



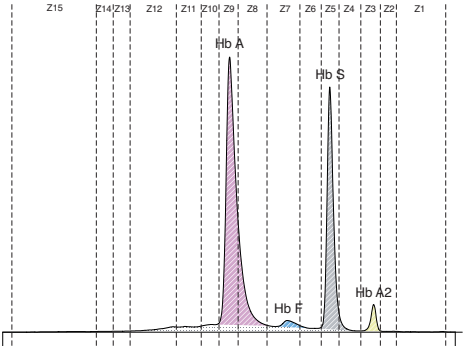
Sang bêta-thalassémique
Blood sample with beta-thalassemia

Figure 3



Sang avec variant Hb C
Blood sample with Hb C variant

Figure 4

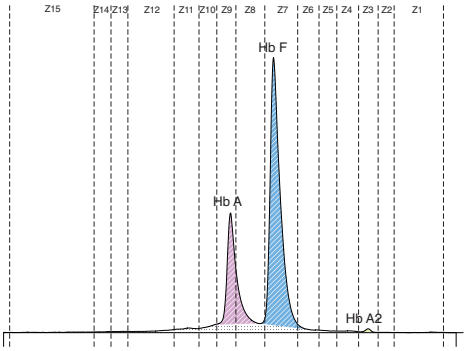


Sang avec variant hétérozygote Hb S
Blood sample with Hb S heterozygote variant

SCHÉMAS / FIGURES

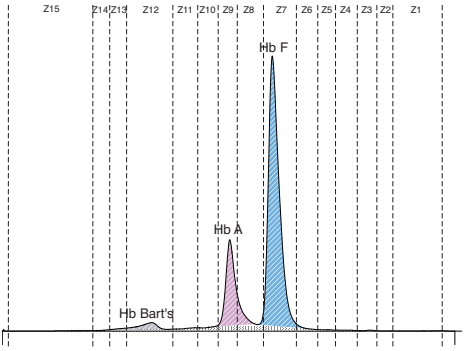
PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES - ELECTROPHORETIC PATTERNS

Figure 5



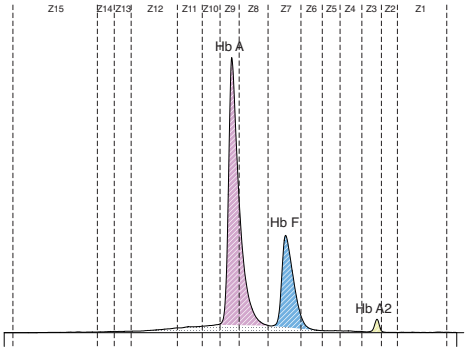
Sang de bébé (agé de 3 semaines)
Baby blood sample (3 weeks old)

Figure 6



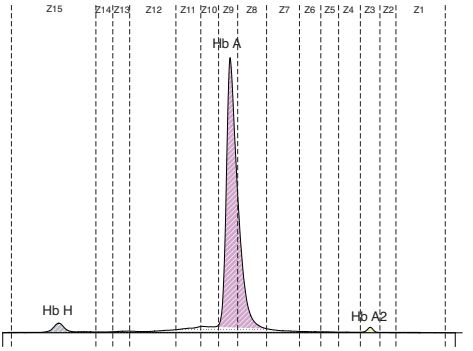
Sang de bébé avec Hb Bart's
Baby blood sample with Hb Bart's

Figure 7



Sang avec Hb F (jeune enfant)
Blood sample with Hb F (young child)

Figure 8

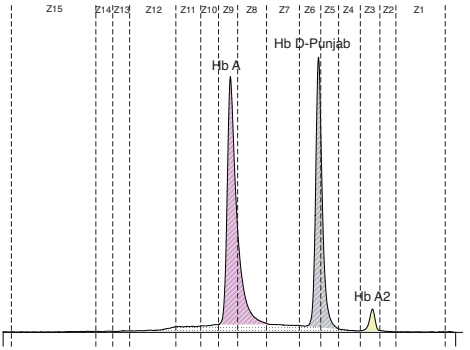


Sang avec Hb H
Blood sample with Hb H

SCHÉMAS / FIGURES

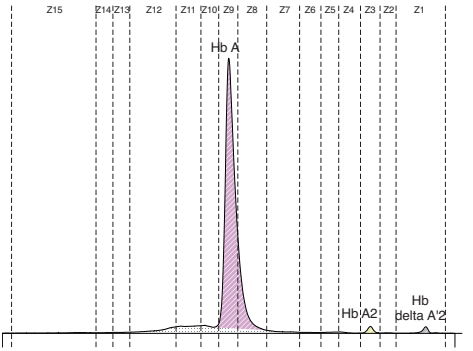
PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES - ELECTROPHORETIC PATTERNS

Figure 9



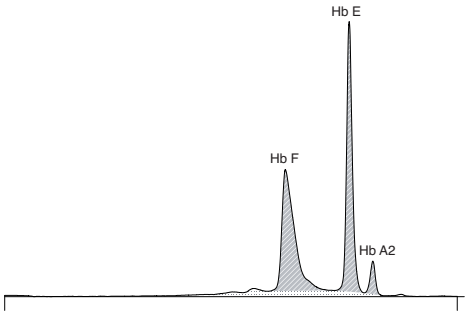
Sang avec variant Hb D-Punjab
Blood sample with Hb D-Punjab variant

Figure 10



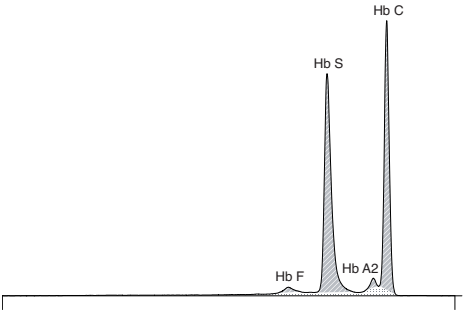
Sang avec variant delta Hb A'2
Blood sample with delta Hb A'2 variant

Figure 11



Sang avec variant homozygote Hb E et fraction Hb F élevée
Blood sample with homozygote Hb E variant and elevated Hb F

Figure 12

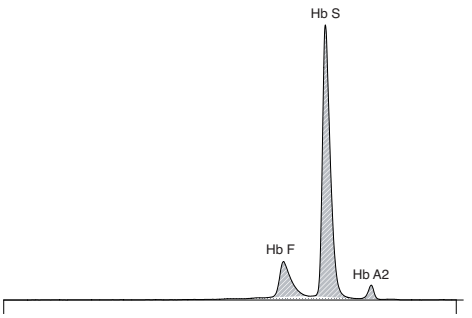


Sang avec variants hétérozygotes Hb S et Hb C
Blood sample with Hb S & Hb C heterozygote variants

SCHÉMAS / FIGURES

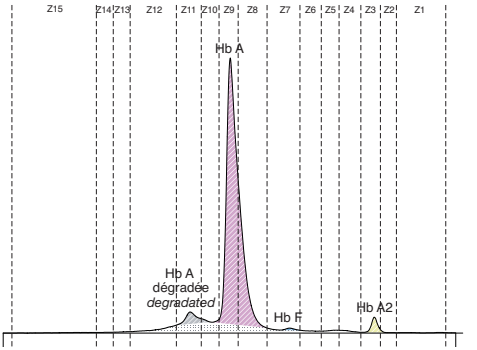
PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES - ELECTROPHORETIC PATTERNS

Figure 13



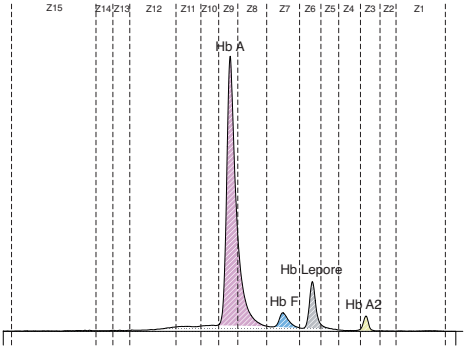
Sang avec variant homozygote Hb S (et Hb F)
Blood sample with Hb S homozygote variant (and Hb F)

Figure 14



Sang avec Hb A dégradée (Hb A3) et Hb F faible
Blood sample with degradated Hb A (Hb A3) and faint Hb F

Figure 15



Sang avec variant Hb Lepore
Bood sample with Hb Lepore variant